

09/582842

PCT/JP99/06172

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

05.11.99

ESU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年11月 6日

REC'D 06 JAN 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第316172号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

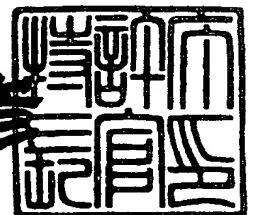
株式会社ヤترون
キッコーマン株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3085317

【書類名】 特許願

【整理番号】 IAT98008P

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 架橋アビジンを用いる結合分析方法並びに結合分析用試薬及びキット

【請求項の数】 17

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤترون内

 【氏名】 杉山 和之

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤترون内

 【氏名】 星野 信広

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内

 【氏名】 辰巳 宏樹

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内

 【氏名】 福田 賢

【特許出願人】

 【識別番号】 000138277

 【氏名又は名称】 株式会社ヤترون

【特許出願人】

 【識別番号】 000004477

 【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100090251

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 憲一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 017813

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 架橋アビジンを用いる結合分析方法並びに結合分析用試薬及びキット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) ビオチン導入結合成分、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入酵素を使用することを特徴とする、結合分析方法。

【請求項 2】 結合成分が、抗体、抗体フラグメント、抗原、DNA、RNA、受容体、受容体に対するリガンド、酵素、酵素に対するリガンド、酵素アナログ、酵素アナログの元となる酵素の基質、レクチン、又は糖である、請求項 1 に記載の結合分析方法。

【請求項 3】 抗体フラグメントが Fab' である、請求項 2 に記載の結合分析方法。

【請求項 4】 前記ビオチン導入酵素が、ビオチンが導入された酵素-ビオチンアクセプター融合タンパク質である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の結合分析方法。

【請求項 5】 前記酵素がルシフェラーゼである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の結合分析方法。

【請求項 6】 架橋アビジンが、架橋卵白アビジン、架橋ストレプトアビジン、又は架橋リコンビナントアビジンである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の結合分析方法。

【請求項 7】 架橋アビジンを含むことを特徴とする、結合分析用試薬。

【請求項 8】 架橋アビジン及びビオチン化剤を含むことを特徴とする、結合分析用キット。

【請求項 9】 ビオチン導入酵素を更に含む、請求項 8 に記載の結合分析用キット。

【請求項 10】 架橋アビジンとビオチン導入酵素との混合物、及びビオチン化剤を含むことを特徴とする、結合分析用キット。

【請求項 11】 (1) ビオチン導入結合成分、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入酵素を含むことを特徴とする、結合分析用キット。

【請求項12】 結合成分が、抗体、抗体フラグメント、抗原、DNA、RNA、受容体、受容体に対するリガンド、酵素、酵素に対するリガンド、酵素アナログ、酵素アナログの元となる酵素の基質、レクチン、又は糖である、請求項11に記載の結合分析用キット。

【請求項13】 抗体フラグメントがFab'である、請求項12に記載の結合分析用キット。

【請求項14】 (1) ビオチン導入抗体フラグメントFab'、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入酵素を含むことを特徴とする、結合分析用キット。

【請求項15】 (1) ビオチン導入抗体フラグメントFab'と(2) 架橋アビジンと(3) ビオチン導入酵素とを、それらの混合物の形で含む、請求項14に記載の結合分析用キット。

【請求項16】 (1) ビオチン導入抗体フラグメントFab'と(2) 架橋アビジンとを、それらの混合物の形で含む、請求項14に記載の結合分析用キット。

【請求項17】 (2) 架橋アビジンと(3) ビオチン導入酵素とを、それらの混合物の形で含む、請求項14に記載の結合分析用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、架橋アビジンを用いる結合分析方法、並びに結合分析用試薬及び結合分析用キットに関する。なお、本明細書における「分析」には、分析対象化合物の存在の有無を判定する「検出」と、分析対象化合物の存在量を決定する「定量」との両方が含まれる。

【0002】

【従来の技術】

抗原抗体反応を利用した高感度測定法の一つに酵素免疫測定法があり、代表的なものとして、ヘテロジニアスエンザイムイムノアッセイ、例えば、固相化抗体と標識化抗体とを用いたサンドイッチ法、又は固相化抗体と標識化抗原とを用い

た競合法等がある。

【0003】

これらの方法で用いられる酵素標識化抗原又は酵素標識化抗体は、種々の方法で調製されてきた。例えば、初期には、抗原又は抗体と酵素との混合液に、二価性の反応性を有するグルタルアルデヒドを加え、抗原又は抗体と酵素とのポリマーをランダムに調製する方法が開発された。その後、ペルオキシダーゼの表面アミノ基が少ないこと、そして、化学反応試薬に対しての耐性が強いことを利用した改良も試みられた。すなわち、まず、ペルオキシダーゼにグルタルアルデヒドを反応させた後に、過剰のアルデヒド基を除去し、得られたアルデヒド導入ペルオキシダーゼと、抗体とを混合することにより、必要な酵素標識化抗体のみを合成する方法が開発された。また、ペルオキシダーゼが糖鎖を持つことを利用して、過ヨウ素酸で糖鎖を酸化してアルデヒドを生じさせ、抗体のアミノ基と結合させることにより、高収率に酵素標識化抗体を得る方法も開発された。

【0004】

一方、種々の架橋剤も開発され、抗体と酵素とを結合する反応に用いられるようになった。その中でも、スクシンイミドとマレイミド基とを両端に持つようなヘテロバイファンクショナルな架橋剤が開発され、酵素のアミノ基と抗体のヒンジ領域のSH基とを特異的に結合し、収率良く酵素標識化抗体を得ることもできるようになった。

【0005】

抗原又は抗体と酵素とを架橋剤で結合する前記方法以外にも、アビジン-ビオチン反応を利用した抗原又は抗体と酵素との結合方法も開発されてきた。この方法では、二つの試薬を組み合わせる使用する方法が一般的である。すなわち、一方では、ビオチン化試薬を用いることにより、抗原又は抗体にビオチンを導入した抗原又は抗体（ビオチン導入抗原又はビオチン導入抗体）を調製しておき、他方では、（１）化学結合法、あるいは、（２）ビオチン導入酵素とアビジンとを適当な比率で混合することにより、酵素とアビジンとの複合体（酵素標識化アビジン）を調製しておく。

【0006】

ここで、前記化学結合法(1)は、酵素とアビジンとを、グルタルアルデヒド又はヘテロバイファンクショナルな架橋剤で結合するもので、酵素と抗体との組合せに代えて、酵素とアビジンとを組み合わせること以外は、前記の酵素標識化抗体調製法をそのまま利用することができる。

一方、前記方法(2)で使用する前記ビオチン導入酵素は、酵素として、例えば、ルシフェラーゼを使用する場合に、遺伝子操作法により得ることができる。例えば、ルシフェラーゼの遺伝子とビオチンアクセプターの遺伝子とを連結させた遺伝子を宿主細胞内で発現させると、ルシフェラーゼ-ビオチンアクセプター融合タンパク質が宿主細胞内で合成され、続いて、この融合タンパク質に、宿主細胞の働きによりビオチンが結合され、ビオチン導入酵素(ビオチンが導入されたルシフェラーゼ-ビオチンアクセプター融合タンパク質)を得ることができる。

【0007】

このようにして得られたビオチン導入抗原又はビオチン導入抗体と、酵素標識化アビジンとを用いる方法では、一般に、分析対象化合物(抗原)を含む被検試料と、抗体固定化担体とを反応させた後、洗浄操作を行い、次に、前記ビオチン導入抗体を反応させ、再び洗浄を行った後、酵素標識化アビジンを反応させ、抗体固定化担体と分析対象化合物との複合体に結合した酵素標識化アビジン由来の酵素量を測定することにより、抗原量を知ることができる。

【0008】

このようなアビジン-ビオチン反応を利用した免疫測定法は、予め酵素標識化アビジンを調製しておけば、種々の抗体をビオチン化するだけで標識物として使用することができるという点や、化学的な処理で活性に大きなダメージを受ける酵素でも、遺伝子操作でビオチン導入酵素として発現させることにより、活性を維持したまま酵素標識化アビジンとして用いることができるというメリットがあるが、操作ステップが多くなることや、測定毎のデータに再現性が乏しいという欠点を持っている。

反応ステップを減らすために、ビオチン導入抗体、アビジン、及びビオチン導入酵素の三者を予め混合して、酵素標識化抗体(ビオチン導入抗体-アビジン-

ビオチン導入酵素複合体)として用いる試みもなされたが、反応性が著しく低下したり、安定性が非常に悪くなったりして、そのままでは試薬として使用することはできなかった。

【0009】

また、前記アビジン-ビオチン反応は、前記の免疫学的分析方法以外にも、DNAプローブを用いるDNA又はRNA分析方法、あるいは、受容体-リガンド分析方法にも適用されており、これらの分析方法にアビジン-ビオチン反応を適用した場合にも、免疫学的分析方法と同様の問題があった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の課題は、前記の従来技術の欠点を解消し、アビジン-ビオチン反応の長所を有しながら、操作ステップが少なく、迅速且つ簡易であって、しかも、正確な分析方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

前記課題は、本発明による、(1)ビオチン導入結合成分、(2)架橋アビジン、及び(3)ビオチン導入酵素を使用することを特徴とする、結合分析方法により解決することができる。

また、本発明は、架橋アビジンを含むことを特徴とする、結合分析用試薬に関する。

更に、本発明は、(1)ビオチン導入結合成分、(2)架橋アビジン、及び(3)ビオチン導入酵素を含むことを特徴とする、結合分析用キットに関する。

【0012】

本明細書において、「結合分析」とは、2種類の化合物が相互に特異的に結合する性質を利用して、2種類の前記化合物の内のいずれか一方を分析対象化合物とする分析を意味する。特異的な結合を示す前記の2種類の化合物の組み合わせとしては、例えば、抗原と抗体との組み合わせ、DNAとそれに相補的なDNA若しくはRNAとの組み合わせ、RNAとそれに相補的なDNA若しくはRNAとの組み合わせ、受容体とそのリガンド(例えば、ホルモン、サイトカイン、神

経伝達物質、又はレクチン）との組み合わせ、酵素とそのリガンド（例えば、酵素の基質アナログ、補酵素、調節因子、又は阻害剤）との組み合わせ、酵素アナログとその酵素アナログの元となる酵素の基質との組み合わせ、又はレクチンと糖との組み合わせを挙げることができる。なお、「酵素アナログ」とは、元の酵素に対する基質との特異的な親和性は高いものの、触媒活性を示さないものをいう。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明では、「アビジン」として、ビオチンに特異的に強く結合することのできる任意のアビジン、例えば、卵白アビジン、ストレプトアビジン、又は遺伝子操作で得られたアビジン（すなわち、リコンビナントアビジン）等を用いることができる。

アビジンは、同一のサブユニット四個からなるタンパク質である。各サブユニットにはビオチン結合部位が1箇所ずつ存在するため、1分子のアビジンには4分子のビオチンが結合することができる。各サブユニットは共有結合で結合していないため、アビジンに高い熱が加わると、各サブユニットに開裂してしまうことが知られている。

【0014】

本発明において使用する架橋アビジンは、アビジンの少なくともサブユニット間が架橋（すなわち、分子内架橋）されているものを意味する。前記架橋アビジンには、アビジン1分子のみからなる架橋アビジンモノマー、及び複数のアビジン分子が、更に分子間架橋により共有結合で結合されている架橋アビジンポリマーの両方が含まれる。

【0015】

前記の架橋アビジンは、アビジンを架橋剤で処理することにより得ることができる。前記架橋剤としては、例えば、アミノ基同士を結合する架橋剤としてのグルタルアルデヒド、ジスクシンイミド、ジメチルピメルイミデート、若しくはジメチルスベルイミデート、又はアミノ基とカルボキシ基とを縮合反応させる架橋剤としての種々のカルボジイミド〔例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルア

ミノプロピル) カルボジイミド等] を使用することができる。

【0016】

本発明において使用するビオチン導入酵素は、例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、又は β -D-ガラクトシダーゼ等の酵素をビオチン化したものである。

【0017】

このようなビオチン導入酵素は、例えば、化学的修飾法又は遺伝子操作法を用いることにより調製することができる。

前記化学的修飾法は、酵素アミノ酸残基に対して化学的にビオチンを結合させる方法である。

【0018】

一方、前記遺伝子操作法は、酵素とビオチンアクセプターとの融合タンパク質を宿主細胞中で発現させることにより、ビオチン導入酵素を得るものである。化学的修飾に対して非常に不安定である酵素（例えば、ルシフェラーゼ等）の場合には、遺伝子操作法を用いることが好ましい。前記ビオチンアクセプターとは、宿主細胞中でビオチンを付加される一定のアミノ酸配列を含むタンパク質の総称であり、目的に応じてアクセプタータンパク質に翻訳される配列を含む遺伝子を用いることができる。

酵素（例えば、ルシフェラーゼ）の遺伝子とビオチンアクセプターの遺伝子とを連結させた遺伝子を宿主細胞内で発現させると、酵素-ビオチンアクセプター融合タンパク質が宿主細胞内で合成され、続いて、この融合タンパク質に、宿主細胞の働きによりビオチンが結合され、ビオチン導入酵素（ビオチンが導入された酵素-ビオチンアクセプター融合タンパク質）を得ることができる。

【0019】

本発明において使用することのできるビオチン導入結合成分における結合成分としては、ビオチンを導入することのできる結合成分である限り、特に限定されるものではなく、例えば、(a) タンパク質である抗体（モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方を含む）、抗体フラグメント [例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv]、タンパク質抗原、受容体、タンパク質ホル

モン、サイトカイン、レクチン、酵素、又は酵素アナログ、(b) 核酸である DNA 又は RNA、あるいは、(c) タンパク質又は核酸以外の化合物である非タンパク質抗原、非タンパク質ホルモン、酵素に対するリガンド（例えば、酵素の基質アナログ、補酵素、転写因子、若しくは阻害剤）、酵素アナログの元となる酵素の基質、又は糖を挙げることができる。

【0020】

本発明の分析方法において使用することのできるビオチン導入結合成分の内、結合成分がタンパク質であるもの（例えば、抗体、抗体フラグメント、タンパク質抗原、受容体、タンパク質ホルモン、サイトカイン、レクチン、酵素、又は酵素アナログ）については、ビオチン導入酵素に関して説明した前記の調製方法、すなわち、化学的修飾法又は遺伝子操作法を用いて、結合成分にビオチンを導入することにより調製することができる。

【0021】

また、本発明の分析方法において使用することのできるビオチン導入結合成分の内、結合成分が核酸であるもの（例えば、DNA 又は RNA）については、公知の方法を用いて、結合成分にビオチンを導入することにより調製することができる。前記公知方法としては、例えば、4 種類のヌクレオチドの内、1 種類をビオチン化ヌクレオチド（例えば、ビオチン化 dUTP 又はビオチン化 UTP）に置き換えて実施するニックトランスレーション法又はプライマー伸長法、あるいは、4 種類のヌクレオチドの内、1 種類をアミノ化ヌクレオチド（例えば、アミノ-7-dUTP）に置き換えて DNA 合成を行ない、得られた修飾 DNA と適当なビオチン誘導体とを反応させる方法を挙げることができる。

前記ニックトランスレーション法又はプライマー伸長法に用いるビオチン化 dUTP 又はビオチン化 UTP として、例えば、dUTP 又は UTP のピリミジン環の 5 位の炭素原子にリンカーを介してビオチンを結合させたものが市販されており、それを使用することができる。

【0022】

更に、本発明の分析方法において使用することのできるビオチン導入結合成分の内、結合成分がタンパク質又は核酸以外の化合物であるものについては、公知

の方法を用いて、結合成分にビオチンを導入することにより調製することができる。

【0023】

本発明において使用するビオチン導入結合成分としては、1分子中に含まれるビオチン数が1であるビオチン導入結合成分（すなわち、結合成分1分子に対してビオチン1分子を導入したビオチン導入結合成分）が好ましく、本発明の好適態様においては、ビオチン導入結合成分として、ビオチン導入抗体フラグメントF a b'を用いることができる。前記ビオチン導入抗体フラグメントF a b'は、分析対象化合物に特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方を含む）から得られる抗体フラグメントF a b'に、ビオチン1分子を共有結合により導入したものである。

【0024】

前記抗体フラグメントF a b'は、抗体をペプシンで消化することにより得られる抗体フラグメントF (a b')₂を、更に還元剤（例えば、β-メルカプトエタノール又はメルカプトエチルアミン）で還元することにより調製することができる。すなわち、抗体分子のヒンジ領域には、2本のH鎖を連結するS-S結合1個が存在しており、このS-S結合のC末端側下流で、ペプシンによる分解を受けるので、抗体フラグメントF (a b')₂のC末端側領域には、前記S-S結合が残っている。続いて、還元剤により前記S-S結合を還元すると、抗体フラグメントF (a b')₂1分子から、C末端側領域にSH基1つを有する抗体フラグメントF a b'2分子が生じる。

このようにして得られたSH基1つを有する抗体フラグメントF a b'と、マレイミド基を有するビオチン誘導体とを反応させると、抗体フラグメントF a b'1分子当たり、ビオチン1分子が導入されたビオチン導入抗体フラグメントF a b'を得ることができる。

【0025】

本発明の分析方法において使用することのできるビオチン導入抗原は、抗原に、ビオチン1分子を共有結合により導入したものである。このようなビオチン導入抗原は、ビオチン導入酵素に関して説明した前記の調製方法、すなわち、化学

的修飾法又は遺伝子操作法を用いて調製することができる。

【0026】

本発明においては、分析対象化合物に応じて、適宜、適当なビオチン導入結合成分を選択することができる。例えば、分析対象化合物が抗原である場合には、その抗原に特異的に反応する抗体又は抗体フラグメント〔例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv〕にビオチンを導入したビオチン導入抗体又はビオチン導入抗体フラグメントを；分析対象化合物が抗体である場合には、その抗体が認識する抗原にビオチンを導入したビオチン導入抗原を；分析対象化合物がDNA又はRNAである場合には、それに相補的なDNA又はRNAにビオチンを導入したビオチン導入DNA又はビオチン導入RNAを；分析対象化合物が受容体である場合には、その受容体に対するリガンドにビオチンを導入したビオチン導入リガンドを；分析対象化合物が受容体のリガンドである場合には、そのリガンドに対する受容体にビオチンを導入したビオチン導入受容体を；分析対象化合物が酵素である場合には、その酵素に対するリガンドにビオチンを導入したビオチン導入リガンドを；そして、分析対象化合物が酵素のリガンドである場合には、その酵素にビオチンを導入したビオチン導入酵素を、それぞれ使用することができる。

【0027】

以下、ビオチン導入結合成分として、ビオチン導入抗体フラグメントFab'を使用する場合の態様に主に基づいて、本発明（本発明の分析方法、本発明の分析用試薬、及び本発明の分析用キット）を説明する。

このようにして得られた（１）ビオチン導入抗体フラグメントFab'と、（２）架橋アビジンと、（３）ビオチン導入酵素とを、適当な比率で混合することにより、酵素活性及び抗体活性を共に維持した状態で酵素標識化抗体を得ることができる。これらの酵素標識化抗体を、本発明の分析方法で 사용할 ことができる。

【0028】

また、（１）ビオチン導入抗体フラグメントFab'と、（２）架橋アビジンと、（３）ビオチン導入酵素とは、それぞれ別々に使用することもできる。例え

ば、抗体固定化担体と分析対象化合物（抗原）とを反応させた後に、

（a）前記の 3 種類の試薬をこの順に添加し、三段階で反応させることもできるし、

（b）ビオチン導入抗体フラグメント F a b' と架橋アビジンとを予め混合しておいたものを反応させた後に、ビオチン導入酵素を反応させ、二段階で反応させることもできるし、あるいは、

（c）ビオチン導入抗体フラグメント F a b' を反応させた後に、架橋アビジンとビオチン導入酵素とを予め混合しておいたものを反応させ、二段階で反応させることもできる。

これらの 3 種類の試薬を、予め全て混合して使用するか、あるいは、別々に使用するかは、それぞれの測定系に応じて適宜決定することができる。

【0029】

本発明の分析方法では、（1）ビオチン導入抗体フラグメント F a b'、（2）架橋アビジン、及び（3）ビオチン導入酵素を使用すること以外は、従来公知の免疫学的分析方法、例えば、サンドイッチ法又は競合法にそのまま適用することができる。

【0030】

例えば、サンドイッチ法を利用し、（1）ビオチン導入抗体フラグメント F a b' と、（2）架橋アビジンと、（3）ビオチン導入酵素とを、適当な比率で混合して得られた酵素標識化抗体を用いる本発明の分析方法では、具体的には、ビオチン導入抗体フラグメント F a b' とは異なるエピトープで分析対象化合物と反応する抗体又は抗体フラグメントを適当な不溶性担体に固定化する（第 1 抗体）。次に、不溶性担体と被検試料との非特異的結合を避けるために、適当なブロッキング剤〔例えば、ウシ血清アルブミン（B S A）やゼラチン等〕で不溶性担体の表面を被覆する。続いて、被検試料を加えて一定時間（たとえば、5 分～3 時間）及び一定温度（例えば、4℃～40℃、好ましくは室温付近）で接触させ、反応させる（1 次反応）。続いて、3 種類の試薬の混合物である前記酵素標識化抗体を加えて一定時間（たとえば、5 分～3 時間）及び一定温度（例えば、4℃～40℃、好ましくは室温付近）で接触させ反応させる（2 次反応）。これを

適当な洗浄液（例えば、界面活性剤を含む生理食塩水）で洗浄してから、不溶性担体上に存在する酵素標識化抗体の量を定量する。その値から、被検試料中の分析対象化合物の量を算出することができる。

本発明の分析方法においては、3種類の試薬の混合物である酵素標識化抗体を添加して一段階で反応させる代わりに、先に説明したように、3種類の試薬を別々に加えて二段階又は三段階で反応させることもできる。

【0031】

本発明の分析方法に使用する架橋アビジンは、分子内架橋により各サブユニットが共有結合により連結されているので、（1）ビオチン導入抗体フラグメントF a b'と（2）架橋アビジンと（3）ビオチン導入酵素とを適当な比率で混合し、酵素標識化抗体を調製しても、その酵素活性及び抗体活性を安定に維持することができる。それに対して、架橋されていないアビジンを使用する従来公知の酵素標識化抗体（すなわち、ビオチン導入抗体-アビジン-ビオチン導入酵素複合体）では、酵素標識化抗体としての反応性が著しく低下する。この理由は、アビジン1分子にビオチン2分子（ビオチン導入抗体及びビオチン導入酵素）が結合すると、高い熱を加えた場合と同様に、アビジンに強い力が加わり、サブユニットへと開裂してしまうためと考えられる。

【0032】

更に、本発明の分析方法では、1分子中に含まれるビオチン数が1であるビオチン導入抗体フラグメントF a b'及びビオチン導入酵素を使用すると、酵素標識化抗体の酵素活性及び抗体活性を更に安定に維持することができる。もしも、抗体フラグメントF a b'、抗原、又は酵素中に複数のビオチン分子が存在すると仮定すると、アビジンを介して連鎖的に結合反応が進行し、酵素標識化抗体が巨大分子化し、沈殿形成など好ましくない反応を起こすことが予想されるからである。

【0033】

本発明の分析用試薬は、架橋アビジンを含む。本発明の分析用試薬は、他の試薬、例えば、ビオチン導入抗体フラグメントF a b'及びビオチン導入酵素と組み合わせ、本発明の分析方法に用いることができる。

【0034】

本発明の分析用キットは、架橋アビジン及びビオチン化剤を含む。前記ビオチン化剤としては、従来公知のビオチン化剤を使用することができ、例えば、N-ビオチノイル-N'-(6-マレイミドヘキサノイル)-ヒドラジド、又はビオチニル-ε-アミノカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル等を挙げることができる。前記分析用キットとは別に用意した抗体フラグメントFab'及び酵素を、前記ビオチン化剤によりビオチン化して得られるビオチン導入抗体フラグメントFab'及びビオチン導入酵素と、前記分析用キットに含まれる架橋アビジンとを組み合わせ、本発明の分析方法に用いることができる。

【0035】

本発明の分析用キットは、架橋アビジン及びビオチン化剤に加え、ビオチン導入酵素を更に含むことができる。本発明の分析用キットは、架橋アビジン、ビオチン導入酵素、及びビオチン化剤をそれぞれ別々の試薬として含むこともできるし、あるいは、架橋アビジンとビオチン導入酵素とを予め混合した混合物、及び単独のビオチン化剤として含むこともできる。

【0036】

また、本発明の分析用キットは、前記ビオチン化剤に代えて、ビオチン導入抗体フラグメントFab'及びビオチン導入酵素を含む構成とすることもできる。すなわち、本発明の別の分析用キットは、(1)ビオチン導入抗体フラグメントFab'、(2)架橋アビジン、及び(3)ビオチン導入酵素を含む。本発明の分析用キットは、(1)ビオチン導入抗体フラグメントFab'、(2)架橋アビジン、及び(3)ビオチン導入酵素をそれぞれ別々の試薬として含むこともできるし、あるいは、2以上の試薬を予め混合した混合物として含むこともできる。後者の例示としては、例えば、ビオチン導入抗体フラグメントFab'と架橋アビジンとビオチン導入酵素との混合物を含む分析用キット、ビオチン導入抗体フラグメントFab'と架橋アビジンとの混合物、及び単独のビオチン導入酵素を含む分析用キット、あるいは、単独のビオチン導入抗体フラグメントFab'、及び架橋アビジンとビオチン導入酵素との混合物を含む分析用キットを挙げることができる。

本発明の分析用キットは、それ単独で、あるいは、所望により他の試薬と組み合わせて、本発明の分析方法に使用することができる。

【0037】

以上、ビオチン導入抗体フラグメント F a b' を用いる態様に基づいて本発明を説明したが、前記ビオチン導入抗体フラグメント F a b' の代わりに、ビオチン導入抗原を用いても本発明を実施することができる。

例えば、(1) ビオチン導入抗原と、(2) 架橋アビジンと、(3) ビオチン導入酵素とを、適当な比率で混合して得られた酵素標識化抗原を用いる本発明の分析方法では、例えば、競合法により抗原を免疫学的に分析することができる。具体的には、分析対象化合物と反応する抗体又は抗体フラグメントを適当な不溶性担体に固定化する(第1抗体)。次に、不溶性担体と被検試料との非特異的結合を避けるために、適当なブロッキング剤[例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)やゼラチン等]で不溶性担体の表面を被覆する。続いて、3種類の試薬の混合物である前記酵素標識化抗原と、被検試料とを加えて一定時間(たとえば、5分～3時間)及び一定温度(例えば、4℃～40℃、好ましくは室温付近)で接触させ、反応させる。これを適当な洗浄液(例えば、界面活性剤を含む生理食塩水)で洗浄してから、不溶性担体上に存在する酵素標識化抗原の量を定量する。その値から、被検試料中の分析対象化合物の量を算出することができる。

本発明の分析方法においては、3種類の試薬の混合物である酵素標識化抗原を添加して一段階で反応させる代わりに、先に説明したように、3種類の試薬を別々に加えて二段階又は三段階で反応させることもできる。

【0038】

更には、ビオチン導入抗体フラグメント F a b' 又はビオチン導入抗原に代えて、その他のビオチン導入結合成分、例えば、ビオチン導入抗体、ビオチン導入抗体フラグメント、ビオチン導入DNA、ビオチン導入RNA、ビオチン導入受容体、ビオチン導入酵素、ビオチン導入リガンド(受容体に対するリガンド及び酵素に対するリガンドを含む)、ビオチン導入酵素アナログ、酵素アナログの元となる酵素の基質にビオチンを導入したもの、ビオチン導入レクチン、又はビオチン導入糖を用いても、同様に本発明を実施することができる。

【0039】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

(1) ビオチン導入抗体フラグメントF a b'の調製

ヒト α -フェトプロテイン (AFP) をウサギに対し免疫して得られた抗血清から、AFP固定化セファロース4Bを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーで特異抗体IgG分画を得た。

この特異抗体IgG分画 [0.1M酢酸緩衝液 (pH 4.5)] に2%重量のペプシンを加え、37℃の孵卵器で一夜消化を行い、ゲルクロマトグラフィーで分子量10万の抗体フラグメントF (a b')₂分画を得た。

50mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して透析したF (a b')₂分画5mg (1ml) に、0.25M-2-メルカプトエチルアミン [50mM酢酸緩衝液 (pH 5.0)] 50 μ lを加え、37℃で90分間還元した。得られた反応液を、1mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む50mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したセファデックスG-25カラム (1.5 \times 13cm) に通し、ボイドボリュームに溶出される抗体フラグメントF a b'分画をプールした。

この抗体フラグメントF a b'分画に、ジメチルホルムアミド0.1mlに溶解したN-ビオチノイル-N'-(6-マレイミドヘキサノイル)-ヒドラジド0.4mgを加え、室温で一夜静置反応させた後、生理食塩水で平衡化したセファデックスG-25カラム (1.5 \times 13cm) に通し、ボイドボリュームに溶出されるビオチン導入抗体フラグメントF a b'をプールした。

【0040】

(2) 架橋ストレプトアビジンの調製

0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 1mlに溶解した精製ストレプトアビジン1mgに、1%グルタルアルデヒド溶液 [0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0)] 20 μ lを加え、混合した後、4℃で16時間静置反応した。反応混液に、

0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で調製した4mg/ml水素化ホウ素ナトリウム液20 μ lを加え、室温で4時間静置反応することにより、アルデヒドを還元した。反応混液を0.3M食塩水で平衡化したセファデックスG-25カラム(1.5 \times 15cm)に通し、ボイドボリュームに溶出される架橋ストレプトアビジンをプールした。

【0041】

(3) 抗AFPモノクローナル抗体のコーティング

50mM炭酸緩衝液(pH9.5)で5 μ g/mlに調整した抗AFPモノクローナル抗体(オリエンタル酵母社)100 μ lを、白色96穴プレートの各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振盪コーティングを行った後、洗浄液[0.1%トウイーン20を含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)]で洗浄し、以下の工程に用いた。

【0042】

(4) 酵素標識化抗体の調製

前記実施例1(1)で得られたビオチン導入抗体フラグメントFab'(最終濃度=0.1 μ g/ml)と、前記実施例1(2)で得られた架橋ストレプトアビジン(最終濃度=1.2 μ g/ml)と、ビオチン導入ルシフェラーゼ-ビオチンアクセプター融合タンパク質(キッコーマン社)(最終濃度=0.07 μ g/ml)とを、5%グリセロール、1%ウシ血清アルブミン(BSA)、及び1mM-EDTAを含む50mM-HEPES緩衝液(pH7.5)中で混合し、室温で2時間静置反応してから酵素標識化抗体として、以下の反応に用いた。

【0043】

(5) ELISA法によるAFPの測定

反応緩衝液(0.15M食塩を含む前記洗浄液)で所定濃度(1pg/ml, 10pg/ml, 及び100pg/ml)に希釈した標準AFP溶液100 μ lを抗体コートウェルに分注し、37 $^{\circ}$ Cで1時間振盪反応を行った。洗浄液で4回洗浄した後、実施例1(4)で調製した酵素標識化抗体100 μ lを分注し、37 $^{\circ}$ Cで1時間振盪反応を行った。洗浄液で4回洗浄した後、発光検出器にセットし、0.2mg/mlルシフェリン、40mM-ATP、及び150mM硫酸マ

グネシウムを含む50mM-HEPES緩衝液(pH7.5)100 μ lを基質として加え、10秒間の積算発光量を測定した。

結果を図1に示す。図1から明らかなように、非常に低濃度のAFPに対しても発光量のレスポンスが得られた。

このようにストレプトアビジンを架橋剤処理することにより、ビオチン導入抗体フラグメントFab'とビオチン導入酵素との間を、安定に結合することができることが示された。

【0044】

【比較例1】

比較例として、実施例1(2)で調製した架橋ストレプトアビジンの代わりに、架橋処理を行っていないストレプトアビジンを使用すること以外は、前記実施例1(4)及び実施例1(5)の手順を繰り返した。結果を図2に示す。図2から明らかなように、AFP量に対する発光のレスポンスがほとんど見られず、架橋されていないストレプトアビジンでは、ビオチン導入抗体フラグメントFab'とビオチン導入酵素との間をうまく結合することができないことが確認された。

【0045】

【発明の効果】

本発明によれば、アビジン-ビオチン反応の長所を生かしながら、迅速且つ簡易に、しかも、正確に分析対象化合物の分析を実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

架橋ストレプトアビジンを用いるELISA法により、AFPを測定した結果を示すグラフである。

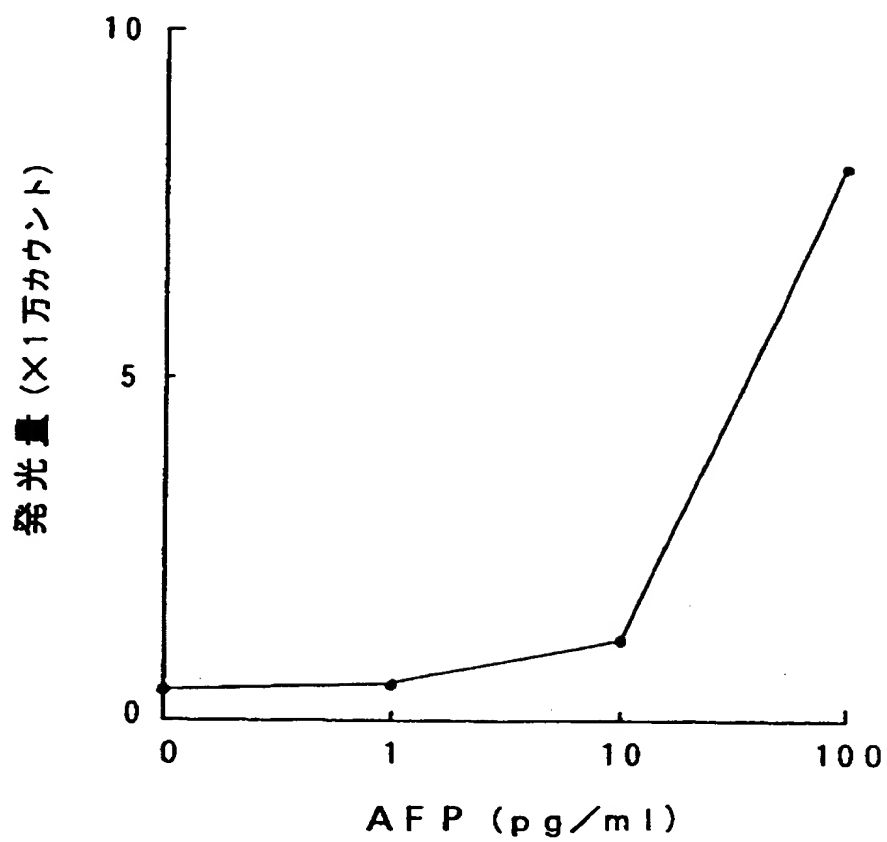
【図2】

架橋されていないストレプトアビジンを用いるELISA法により、AFPを測定した結果を示すグラフである。

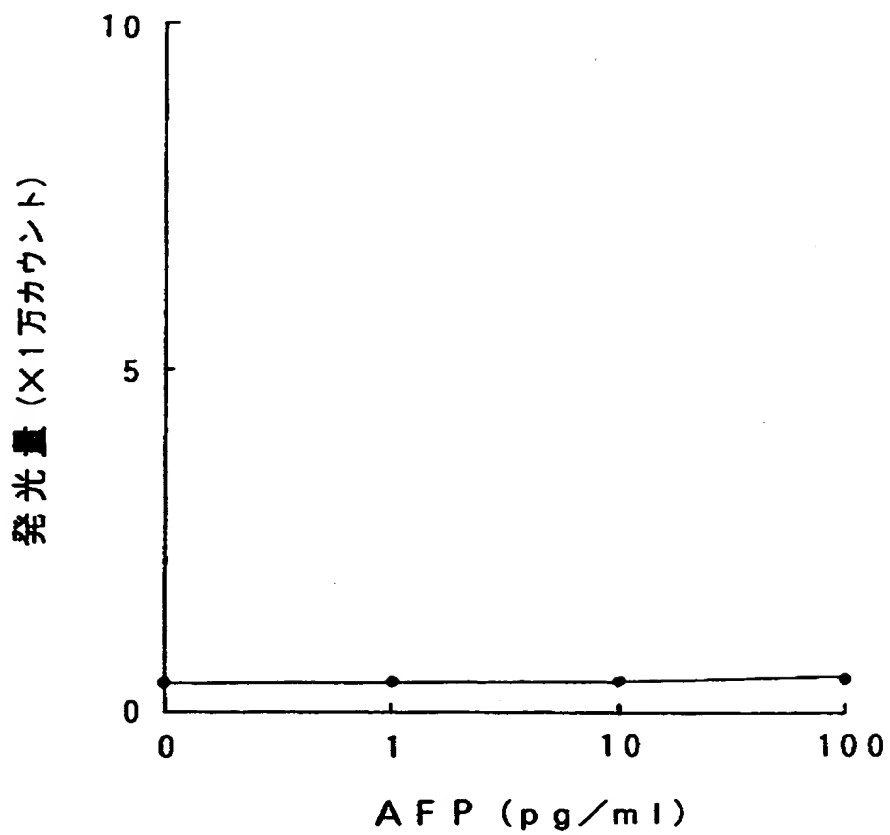
【書類名】

図面

【図1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アビジン-ビオチン反応の長所を生かしながら、迅速且つ簡易に、しかも、正確に分析対象化合物の分析を実施することができる結合分析方法、並びに結合分析用試薬及びキットを提供する。

【解決手段】 前記分析方法では、(1) ビオチン導入結合成分、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入酵素を使用する。前記分析用試薬は、前記架橋アビジンを含む。前記分析用キットは、前記架橋アビジン及びビオチン化剤を含む。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年11月 6日

【特許出願人】

【識別番号】 000138277

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1丁目11番4号

【氏名又は名称】 株式会社ヤترون

【特許出願人】

【識別番号】 000004477

【住所又は居所】 千葉県野田市野田339番地

【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100090251

【住所又は居所】 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル
5階

【氏名又は名称】 森田 憲一

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000138277]

1. 変更年月日 1990年 8月23日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区東神田1丁目11番4号
氏 名 株式会社ヤترون

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004477]

1. 変更年月日 1990年 8月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 千葉県野田市野田339番地
氏 名 キッコーマン株式会社
2. 変更年月日 1999年 8月16日
[変更理由] 住所変更
住 所 千葉県野田市野田250番地
氏 名 キッコーマン株式会社